

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
18 de Agosto de 2005 (18.08.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/076000 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
G01N 33/564, 33/566, C07K 14/705

Avda. Carlos III, 36 - 1º Dcha., 31003 Pamplona, Navarra
(ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/000046

(72) Inventores; e

(22) Fecha de presentación internacional:
3 de Febrero de 2005 (03.02.2005)

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **HER-
MIDA SANTOS, José** [ES/ES]; Fundación para la
Investigación Médica Aplicada, FIMA, Avda. Pío XII,
55, 31008 Pamplona (Navarra) (ES). **MONTES DIAZ,
Ramon** [ES/ES]; Fundación para la Investigación Médica
Aplicad, FIMA, Avda. Pío XII, 55, 31008 Pamplona
(Navarra) (ES). **HURTADO LINARES, Verónica**
[ES/ES]; Fundación para la Investigación Médica Apli-
cada, FIMA, Avda. Pío XII, 55, 31008 Pamplona (Navarra)
(ES).

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200400269 6 de Febrero de 2004 (06.02.2004) ES

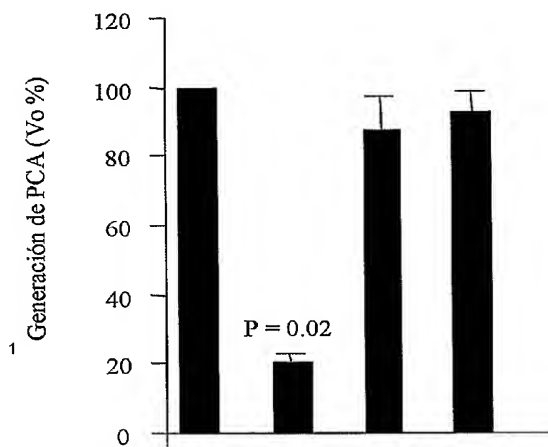
(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L. [ES/ES];

(74) Mandatario: **UNGRÍA LÓPEZ, Javier**; Avda. Ramón y
Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD OF ASSESSING RISK OF AND PREDISPOSITION TO THE DEVELOPMENT OF A PATHOLOGY RE-
LATED TO THE PRESENCE OF ANTI-EPCR ANTIBODIES

(54) Título: MÉTODO PARA EVALUAR EL RIESGO Y LA PREDISPOSICIÓN A DESARROLLAR UNA PATOLOGIA RE-
LACIONADA CON LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS FRENTE A EPCR



(57) Abstract: The invention relates to a method of detecting the presence of high levels of antibodies against the endothelial receptor of activated PC/PC (EPCR). The invention is characterised in that it comprises the detection and quantification *in vitro* of anti-EPCR antibodies in a sample.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR), caracterizado porque comprende la detección y cuantificación *in vitro* de autoanticuerpos frente al EPCR en una muestra.

1 GENERATION OF PCA (VOL %)
3 BUFFER
4 PATIENT C IGM
5 PATIENT C ANTI-EPCR IGM ELIMINATED
6 CONTROL IGM

WO 2005/076000 A1



(81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO

(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

METODO PARA EVALUAR EL RIESGO Y LA PREDISPOSICIÓN A DESARROLLAR UNA PATALOGIA RELACIONADA CON LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS FRENTE A EPCR

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un método para detectar niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la proteína C/proteína C activada (EPCR) en una muestra, mediante su detección y
10 cuantificación *in vitro*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes son unas enfermedades
15 que se caracterizan por la presencia de reacciones inmunológicas en las que algo desencadena la reacción del sistema inmune contra los propios tejidos del cuerpo y la producción de anticuerpos anormales que atacan a dichos tejidos (autoanticuerpos). Entre dichas enfermedades
20 autoinmunes se encuentran el síndrome antifosfolípido (SAF), la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, las vasculitis autoinmunes en general, etc.

El SAF se caracteriza por trombosis vascular (venosa, arterial o microvascular) y complicaciones en el
25 embarazo (muerte fetal, nacimiento prematuro o aborto espontáneo múltiple) asociadas con la presencia de anticuerpos antifosfolípido. Estos anticuerpos son heterogéneos y reconocen una variedad de combinaciones de fosfolípidos, proteínas de unión de fosfolípidos o ambas.
30 Los subgrupos más comúnmente detectados de anticuerpos antifosfolípido son los anticuerpos anticoagulante lúpico (ACL), anticuerpos anticardiolipina y anticuerpos

antiglicoproteína I β 2. Otros anticuerpos antifosfolípido no incluidos en los criterios clásicos de laboratorio están actualmente bajo estudio. Tales anticuerpos están dirigidos frente a fosfolípidos distintos a la
5 cardiolipina, tales como la fosfatidiletanolamina, o frente a proteínas de unión de fosfolípidos, tales como la anexina V y la proteína S. Sin embargo, se conoce poco sobre los mecanismos que relacionan la presencia de anticuerpos antifosfolípido con la trombosis vascular y
10 la pérdida del embarazo.

Enfermedades vasculares

Las enfermedades vasculares son de tres tipos fundamentales dependiendo del tipo de vaso afectado
15 (arterial, venoso o vasos de pequeño calibre de la microcirculación). En el caso de las enfermedades vasculares arteriales se produce una esclerosis de su pared que disminuye el flujo a través de su luz y, por lo tanto, disminuye de modo crónico el aflujo de sangre a
20 los territorios irrigados por esa arteria lesionada. La lesión aterosclerótica se puede complicar y originar un trombo dentro de la arteria taponando totalmente el vaso y cerrando, de este modo, el flujo de sangre, en cuyo caso se produce un infarto. Los más frecuentes son el
25 infarto de miocardio cuando la arteria trombosada es una arteria coronaria y el infarto cerebral cuando la arteria trombosada es una arteria que riega el cerebro. En el caso de enfermedad vascular venosa la trombosis origina una dificultad en el retorno de la sangre al corazón.
30 Cuando un fragmento del trombo de la pared venosa trombosada se libere entonces migrará hasta quedar

atrapado en la circulación venosa pulmonar, originando una insuficiencia pulmonar aguda, conocida como embolia pulmonar. Las enfermedades de la microcirculación se producen por inflamación y/o trombosis de los vasos de la microcirculación de los diferentes órganos y se manifiestan como fracaso de la función del órgano cuya microcirculación está dañada. Las enfermedades vasculares constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad en los países occidentales. Concretamente, según datos del Instituto Nacional de Estadística del año 2.000, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en España (35,0% aproximadamente del total de defunciones). Entre las causas cardiovasculares más frecuentes, las enfermedades vasculares o trombóticas arteriales del corazón (principalmente el infarto agudo de miocardio) constituyen la primera causa de muerte. Actualmente se conocen varios factores de riesgo moleculares que pueden explicar la aparición de trombosis en algunos pacientes, uno de estos factores de riesgo es la presencia de los denominados anticuerpos antifosfolípido. Originalmente se pensó que estos autoanticuerpos estaban dirigidos frente a fosfolípidos aniónicos; no obstante, posteriormente se ha demostrado que muchos de esos autoanticuerpos están dirigidos frente a complejos que algunas proteínas, tales como la glicoproteína I $\beta 2$ o la protrombina, forman con los fosfolípidos. Más recientemente también se han implicado otras proteínas con función anticoagulante, tales como la proteína C (PC), la proteína S, la trombomodulina o la anexina V, lo cual explicaría por qué la presencia de estos autoanticuerpos predisponen a la trombosis.

Complicaciones obstétricas

Las complicaciones obstétricas son fundamentalmente: la muerte fetal después de la décima semana de embarazo, el nacimiento de niños prematuros, los abortos espontáneos antes de la décima semana del embarazo, el retraso del crecimiento intrauterino, la eclampsia y la pre-eclampsia.

10 EPCR

La proteína C activada (PCA) es una de las proteínas principales reguladoras de la cascada de coagulación. La PC, el zimógeno de la PCA, es activada por la trombina unida a trombomodulina sobre la superficie de las células endoteliales. La PCA, en combinación con la proteína S (su cofactor no enzimático), ejerce su función anticoagulante mediante la proteólisis de los factores V y VIII activados. Se han identificado defectos genéticos y adquiridos en la trombomodulina, la PC y la proteína S en pacientes con trombosis venosa y/o arterial. El receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) es una glicoproteína que se expresa en la membrana de las células endoteliales y que liga de manera específica y con alta afinidad la PC y la PCA. Para que el EPCR sea funcional precisa estar unido a una molécula de fosfolípido que estabiliza su estructura tridimensional. La unión de la PC al EPCR incrementa de forma notable su activación por el complejo trombina-trombomodulina sobre la superficie celular endotelial. La misión del EPCR es concentrar la PC en la superficie endotelial y presentarla al complejo trombina-trombomodulina

favoreciendo de este modo una eficiente activación de la PC. El EPCR aumenta (unas nueve veces aproximadamente) la tasa de activación de la PC en la superficie de células endoteliales *in vivo* por lo que es el responsable del 90% de los niveles de PCA circulantes. Además, sólo cuando la PCA está unida al EPCR puede activar el receptor-1 activado por proteasa activa que genera una señal celular "citoprotectora" y bloquea la apoptosis.

El EPCR se expresa principalmente en el endotelio de las venas y arterias, sobre todo en las de grande y mediano calibre, y, además, se expresa muy intensamente en el sincitiotrofoblasto. En estos lugares el EPCR previene la trombosis y favorece el buen funcionamiento celular tanto del endotelio como del sincitiotrofoblasto. Existen pruebas cada vez más sólidas que apoyan un papel del EPCR en el mantenimiento del embarazo ya que la delección del gen EPCR en ratones "knock out" causa trombosis placentaria y muerte embrionaria temprana en dichos ratones.

20

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la determinación de autoanticuerpos anti-EPCR (IgG, IgA e IgM) en una muestra procedente de un sujeto. Por otro lado, se ha demostrado que estos autoanticuerpos están presentes en pacientes diagnosticados de una enfermedad autoinmune (SAF y lupus eritematoso diseminado), en pacientes con enfermedades vasculares (trombosis venosa y arterial) y en mujeres con complicaciones del embarazo. Los ejemplos que acompañan a esta descripción ilustran, entre otras cosas, el hecho de que la presencia de

autoanticuerpos anti-EPCR en suero o plasma está incrementada en pacientes con enfermedades autoinmunes (determinado en pacientes con SAF o con lupus eritematoso diseminado), en pacientes con enfermedades vasculares, 5 tales como trombosis arterial, por ejemplo, infarto de miocardio (determinado tanto en pacientes con SAF como en pacientes sin SAF), o ictus isquémico cerebral (determinado en pacientes con SAF), o trombosis venosa (determinado en pacientes con SAF), así como en pacientes 10 con complicaciones obstétricas, tales como con muerte fetal (determinado tanto en mujeres con SAF como en mujeres sin SAF) o abortos de repetición (determinado en pacientes con SAF).

Los autores de la presente invención han 15 descubierto que la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR en suero o plasma de pacientes con enfermedades autoinmunes, y/o en pacientes con enfermedades vasculares y/o en pacientes con complicaciones obstétricas, está incrementada en comparación con 20 muestras procedentes de sujetos sanos, no afectados de tales patologías. Estas evidencias convierten a dichos autoanticuerpos anti-EPCR en un marcador útil para evaluar *in vitro* el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la 25 presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR, tal como una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular o complicaciones obstétricas.

Se ha investigado la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR en pacientes con SAF y su relación con la 30 muerte fetal. También se ha estudiado el efecto de estos autoanticuerpos sobre la generación de PCA en la

superficie endotelial. Posteriormente, se ha estudiado la asociación de autoanticuerpos anti-EPCR con la muerte fetal en un estudio pareado de casos y controles. Los resultados obtenidos apoyan el hecho de que autoanticuerpos anti-EPCR constituyen un factor de riesgo para un episodio de muerte fetal. Impedir la activación de la PC sobre las superficies celulares que expresan EPCR, podría ser una de las maneras por las que estos autoanticuerpos ejercen sus efectos patológicos.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 ilustra la expresión de rshEPCR en *Pichia pastoris*. El rshEPCR se purificó a partir del sobrenadante de células de *P. pastoris* transformadas de forma estable, tal como se describe en el apartado relativo a los Materiales y Métodos (véase el Ejemplo). 10 µl de cada una de tres fracciones que contenían rhEPCR fueron separadas por SDS-PAGE y las proteínas fueron detectadas utilizando GELCODE Blue (A) o mediante Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-myc (Invitrogen) (B).

La Figura 2 muestra la comparación del nivel de autoanticuerpos anti-EPCR en pacientes diagnosticados de SAF y en controles. Se muestran los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR. Anticuerpos de isotipo IgM: controles (mediana = 45 UA, unidades arbitrarias), pacientes (mediana = 57 UA); anticuerpos de isotipo IgA: controles (mediana = 31 UA), pacientes (mediana = 39 UA); y anticuerpos de isotipo IgG: controles (mediana = 72 UA), pacientes (mediana = 75 UA).

La Figura 3 muestra el efecto de autoanticuerpos anti-EPCR sobre la generación de PCA por células endoteliales, en donde puede observarse la generación de PCA en presencia de autoanticuerpo anti-EPCR de isotipo M del paciente C comparada con la generación de PCA en ausencia de anticuerpo y en presencia de anticuerpo no inhibidor. Para cada condición se realizaron 2-4 experimentos independientes.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente solicitud de patente, exponemos a continuación el significado de algunos términos y expresiones en el contexto de la invención.

El término "sujeto" se refiere a un miembro de una especie de un animal mamífero, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

La expresión "enfermedades autoinmunes" se refiere a aquellos trastornos en los que el sistema inmune de un individuo reacciona contra sus propios tejidos determinando una gran variedad de enfermedades; a modo ilustrativo, dichas enfermedades autoinmunes incluyen, entre otras, el SAF, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, vasculitis autoinmunes, etc.

La expresión "enfermedades vasculares" se refiere a aquellas enfermedades que afectan a los vasos sanguíneos. Cuando afecta a un vaso arterial se caracterizan por la falta de irrigación sanguínea de un territorio

determinado del organismo y habitualmente es secundaria a la oclusión de alguna arteria, causada ésta por una lesión aterosclerótica de la pared o por una trombosis, o por ambas a la vez. Cuando afecta a un vaso venoso se caracteriza por dificultad en el retorno de la sangre al corazón desde el territorio del organismo afectado y habitualmente es secundario a la oclusión del vaso venoso por un trombo. Cuando afecta a la microcirculación se caracteriza por la dificultad del órgano cuya microcirculación está afectada para realizar su función. A modo ilustrativo, dichas enfermedades vasculares incluyen, entre otras, enfermedades vasculares arteriales, tales como infarto de miocardio, ictus cerebral, accidente cerebral transitorio, isquemia de extremidades, aterosclerosis, aneurisma, etc., así como enfermedades vasculares venosas, tales como trombosis venosa superficial y profunda, embolia pulmonar, etc, y enfermedades vasculares (trombosis) de la microcirculación como el fallo orgánico que ocurre durante infecciones o enfermedades autoinmunes.

La expresión "complicaciones obstétricas" se refiere a aquellos trastornos que afectan al desarrollo del embarazo, tanto los que afectan a la madre como los que afectan al embrión o al feto, tales como, entre otros, el aborto, la muerte fetal, el nacimiento prematuro, el retraso del crecimiento intrauterino, la eclampsia y la pre-eclampsia.

El término "autoanticuerpo" se refiere a los anticuerpos producidos por un sujeto y dirigidos o específicos contra estructuras y tejidos del propio organismo que las produce, tales como, por ejemplo,

autoanticuerpos antiplaquetarios, autoanticuerpos antitiroideos, autoanticuerpos antiglóbulos rojos, etc. En este sentido el término "autoanticuerpo anti-EPCR" se refiere a inmunoglobulinas o anticuerpos producidos por el propio sujeto y dirigidas específicamente contra el EPCR de sus propios tejidos.

El término "epítipo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un determinante antigénico de una proteína tal como la secuencia de aminoácidos de la proteína que un anticuerpo específico reconoce.

Los términos "péptido" y "polipéptido" se refieren a cadenas moleculares de aminoácidos que representan un fragmento proteico. Los términos "proteína" y "péptido", se usan indistintamente.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la producción de autoanticuerpos anti-EPCR en pacientes con enfermedades autoinmunes, y/o en pacientes con enfermedades vasculares y/o en pacientes con complicaciones obstétricas, está aumentada en comparación con muestras procedentes de sujetos sanos, no afectados de tales patologías, lo que convierte a dichos autoanticuerpos anti-EPCR en un marcador útil para evaluar *in vitro* el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR.

Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión "niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR" se refiere a niveles de UA (unidades arbitrarias) iguales o superiores al percentil 50 de la población

normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de UA iguales o superiores al percentil 60 de la población normal, iguales o superiores al percentil 70 de la población normal, iguales o superiores al percentil 80 de la población normal, iguales o superiores al percentil 90 de la población normal, e iguales o superiores al percentil 95 de la población normal. Debido a la variabilidad existente entre los sujetos (por ejemplo, por razones de raza, etc.) es muy difícil, prácticamente imposible, establecer unos valores absolutos indicativos de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR aplicables a todos los sujetos, por lo que dichos percentiles pueden calcularse fácilmente mediante un procedimiento convencional que comprende la realización de un ensayo para determinar en un grupo de sujetos normales (es decir, sujetos a los que en el momento de realización del ensayo no se les ha diagnosticado ninguna enfermedad autoinmune y que no han sufrido ninguna enfermedad vascular ni ninguna complicación obstétrica) los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR. La determinación de los autoanticuerpos anti-EPCR se puede realizar por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante el ELISA descrito en el apartado "Materiales y Métodos" (Ejemplo 1). Lógicamente, cada sujeto tendrá un valor determinado de UA de autoanticuerpos anti-EPCR y existirá un valor UA de auto-anticuerpos anti-EPCR en el que por encima de ese valor estén el 50% de la población analizada, constituyendo dicho valor el percentil 50; evidentemente, existirá también un valor por encima del cual estén el 40% de los sujetos normales ensayados y ese valor se constituye el percentil 60, asimismo,

también otros valores por encima de los cuales estarán el 30%, 20%, 10% y 5% de los sujetos normales ensayados, constituyendo dichos valores los percentiles 70, 80, 90 y 95, respectivamente.

5

La presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en una muestra, caracterizado
10 porque comprende la cuantificación *in vitro* de autoanticuerpos frente al EPCR en dicha muestra procedente de un sujeto. Estos niveles elevados de dichos autoanticuerpos se relacionan con una patología seleccionada entre una enfermedad autoinmune (por
15 ejemplo, SAF, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, vasculitis autoinmunes, etc), una enfermedad vascular (por ejemplo, una enfermedad vascular arterial, tal como infarto de miocardio, ictus cerebral, accidente cerebral transitorio, isquemia de extremidades,
20 aterosclerosis, aneurisma, trombosis, etc., o una enfermedad vascular venosa, tal como trombosis venosa superficial o profunda, embolia pulmonar, etc., o una enfermedad vascular de la microcirculación) y complicaciones obstétricas (por ejemplo, aborto, muerte
25 fetal, nacimiento prematuro, retraso del crecimiento intrauterino, eclampsia, pre-eclampsia, etc.). Del mismo modo, el método objeto de la presente invención se aplica a la determinación de la variación de los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR en el tiempo. Dichas
30 determinaciones objeto de la presente invención se

completan mediante su comparación con los niveles normales de autoanticuerpos anti-EPCR.

Dicho método comprende una etapa de obtención de la
5 muestra del individuo, tal como una muestra de suero o plasma, que se puede obtener por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante una extracción sanguínea.

Las muestras pueden ser obtenidas de sujetos
10 previamente diagnosticados, o no diagnosticados, de dichas enfermedades autoinmunes o vasculares, o con complicaciones obstétricas; o también de un sujeto en tratamiento, o que ha sido tratado previamente contra dichas enfermedades o complicaciones.

15 Dada la naturaleza del método de la invención, la detección y cuantificación de dichos autoanticuerpos anti-EPCR se realiza mediante un ensayo inmunológico acoplado a un marcador que permita detectar y cuantificar la formación de complejos específicos antígeno-
20 anticuerpo, por ejemplo, un ensayo inmunocromatográfico (látex, oro coloidal, etc.), un ensayo inmunológico en el que el marcador es un marcador fluorescente, un isótopo, un metal pesado, una enzima, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente, un cromógeno, etc.

25 Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos, que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-
30 blot o transferencia Western, ELISA (Enzyme-Linked

inmunosorbent assay o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (Radioinmunoassay o Radioinmunoensayo), etc.

En una realización particular, el inmunoensayo preferido en el método de la invención que permite la
5 detección y/o cuantificación de dichos autoanticuerpos anti-EPCR es un ELISA, que comprende:

- 10 a) inmovilizar en un soporte sólido un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR;
- 15 b) incubar dicho polipéptido inmovilizado con una muestra sospechosa de contener autoanticuerpos anti-EPCR procedente de dicho sujeto, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión de dichos anticuerpos al polipéptido inmovilizado y la formación de complejos
20 polipéptido-autoanticuerpo anti-EPCR;
- c) retirar la muestra no unida a dicho polipéptido inmovilizado;
- 25 d) incubar dichos complejos polipéptido-autoanticuerpo anti-EPCR con un segundo anticuerpo conjugado a una enzima, en donde dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo capaz de unirse a dichos autoanticuerpos anti-EPCR.

Dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR, puede ser
5 bien un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR longitud completa, o bien un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento del EPCR que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-
10 EPCR. En una realización particular, dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende:

- (i) una región A constituida por un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos,
15 un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-EPCR, y
- (ii) una región B constituida por un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión y/o una secuencia de aminoácidos útil
20 para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido.

Dicha región B puede estar unida al extremo amino terminal de dicha región A o bien al extremo carboxilo
25 terminal de dicha región A.

En una realización particular, dicha región A comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano.

La región B comprende una secuencia de aminoácidos
30 útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión previamente definida y/o una secuencia de

aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido. Prácticamente cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser utilizada para aislar o purificar una proteína de fusión (denominadas
5 genéricamente péptidos etiqueta o "tag") y/o cualquier secuencia de aminoácidos susceptible de ser utilizada para el anclaje de una proteína de fusión a un soporte sólido puede estar presente en dicha región B. En ocasiones, la secuencia de aminoácidos útil para el
10 aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión puede actuar también como secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido y viceversa. En una realización particular, la región B comprende una secuencia de aminoácidos útil para
15 el aislamiento o purificación de una proteína de fusión y una secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de una proteína de fusión a un soporte sólido.

A modo ilustrativo, dicha secuencia de aminoácidos útil para aislar o purificar una proteína de fusión y/o
20 dicha secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de una proteína de fusión a un soporte sólido puede ser, por ejemplo, Arg-tag, His-tag, FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a
25 calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003), 60:523-525), una secuencia de aminoácidos tal como: Ala-His-Gly-His-Arg-
30 Pro (SEQ ID NO: 4) (2, 4, y 8 copias), Pro-Ile-His-Asp-His-Asp-His-Pro-His-Leu-Val-Ile-His-Ser (SEQ ID NO: 5),

Gly-Met-Thr-Cys-X-X-Cys (SEQ ID NO: 6) (6 repeticiones),
β-galactosidasa, VSV-glicoproteína (YTDIEMNRLGK), etc.

En una realización particular, dicha región B está
constituida por un polipéptido que comprende un epítopo
5 susceptible de ser reconocido por un anticuerpo (tal como
el epítopo c-myc, reconocido por un anticuerpo anti-c-
myc) y una cola de histidinas (His-tag).

En el Ejemplo que acompaña a esta descripción se
describe la obtención de un polipéptido, denominado
10 rhEPCR, consistente en una proteína de fusión que
comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble
del EPCR humano (hEPCR), la secuencia de aminoácidos
correspondiente al epítopo c-myc y una cola de histidinas
y cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID
15 NO: 3.

El polipéptido a utilizar en el método de la
invención puede ser obtenido por métodos convencionales,
por ejemplo, por expresión en un sistema de expresión
adecuado.

20 El segundo anticuerpo a utilizar en el ELISA
previamente mencionado es un anticuerpo específico de
isotipo de inmunoglobulinas y procede de una especie
diferente a la de la muestra analizada, lo que permite
caracterizar el isotipo de los autoanticuerpos anti-EPCR.
25 A modo ilustrativo, dicho segundo anticuerpo específico
de isotipo de inmunoglobulinas se selecciona entre un
anticuerpo anti-IgG humana, un anticuerpo anti-IgM
humana, un anticuerpo anti-IgA humana, y sus mezclas. En
una realización particular, dicho segundo anticuerpo está
30 conjugado a un marcador que permite la detección del

complejo, tal como una enzima, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.

En otro sentido, la invención proporciona un método
5 para evaluar el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en dicho sujeto, que comprende la cuantificación *in vitro* de
10 autoanticuerpos frente al EPCR en una muestra de dicho sujeto.

En una realización particular, la patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto se selecciona
15 entre una enfermedad autoinmune, por ejemplo, SAF, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, vasculitis autoinmunes, etc.; una enfermedad vascular, por ejemplo, una enfermedad vascular arterial, tal como infarto de miocardio, ictus cerebral, accidente cerebral
20 transitorio, isquemia de extremidades, aterosclerosis, aneurisma, trombosis, etc., o una enfermedad vascular venosa, tal como trombosis venosa superficial, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, etc., o una enfermedad vascular de la microcirculación tal como una trombosis de
25 la microcirculación, el fallo orgánico que ocurre durante infecciones o enfermedades autoinmunes, etc., y complicaciones obstétricas, por ejemplo, aborto, muerte fetal, nacimiento prematuro, retraso del crecimiento intrauterino, eclampsia, pre-eclampsia, etc.

30 El método proporcionado por la presente invención se basa en que los sujetos diagnosticados de una enfermedad

autoinmune, vascular o con complicaciones obstétricas presentan niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, en comparación con los correspondientes niveles en muestras procedentes de sujetos sin historial clínico de
5 tales enfermedades o complicaciones obstétricas.

El método para evaluar el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR proporcionado por esta invención, se completa
10 comparando los niveles de autoanticuerpos determinados en la muestra del sujeto en cuestión con los niveles normales, entendiendo por niveles normales los de una población de sujetos normales determinado tal como se ha indicado más arriba al definir la expresión "niveles
15 elevados". Dicho método se basa en ensayos inmunológicos previamente descritos en esta sección.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un sujeto que presente una patología
20 relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en dicho sujeto, que comprende la cuantificación *in vitro* de dichos autoanticuerpos anti-EPCR en una muestra de dicho sujeto. El método se lleva a cabo tal como se ha mencionado previamente, si
25 bien, en este caso, las muestras proceden de sujetos previamente diagnosticados de alguna enfermedad autoinmune o vascular, o que han sufrido alguna complicación obstétrica, sometidos a tratamiento terapéutico, y permite analizar el efecto de la terapia,
30 es decir, su eficacia y efectividad, aplicada al sujeto

en tratamiento con el fin de, por ejemplo, mantener la terapia o modificarla.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de autoanticuerpos anti-EPCR en un método para
5 evaluar la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en una muestra procedente de dicho sujeto. En una realización particular, dicha presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, se relaciona con una patología seleccionada entre
10 una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y complicaciones obstétricas. Un nivel aumentado de autoanticuerpos anti-EPCR se asocia con un mayor riesgo o predisposición a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos
15 anti-EPCR en un sujeto, tal como una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y/o complicaciones obstétricas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un polipéptido que comprende la secuencia de
20 aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR, en un método para evaluar la presencia de autoanticuerpos frente al receptor endotelial EPCR en una muestra. Dicho método
25 comprende la detección y/o cuantificación *in vitro* de autoanticuerpos anti-EPCR en dicha muestra. En una realización particular, dicha patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, se selecciona entre una enfermedad autoinmune, una
30 enfermedad vascular y complicaciones obstétricas.

En una realización particular, dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR es un polipéptido como el definido previamente al describir el ELISA para detectar y/o cuantificar autoanticuerpos anti-EPCR. En una realización particular, dicho polipéptido es el denominado rhEPCR (Ejemplo), consistente en una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano (hEPCR), la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítipo c-myc y una cola de histidinas, y cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para evaluar *in vitro* la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, que comprende un polipéptido que comprende, a su vez, la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR. En una realización particular, dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR, es un polipéptido como el definido previamente al describir el ELISA para detectar y/o cuantificar autoanticuerpos anti-EPCR. En una realización particular, dicho polipéptido es el denominado rhEPCR (Ejemplo), consistente en una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano (hEPCR),

la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítipo c-myc y una cola de histidinas y cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto, dicho kit se emplea para evaluar *in vitro* el riesgo y la predisposición de un individuo para desarrollar una patología asociada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, seleccionada entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y complicaciones obstétricas.

10

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLO 1

Empleo de autoanticuerpos anti-EPCR como marcadores para el riesgo y la predisposición de un sujeto al desarrollo de patologías relacionadas con la presencia de niveles elevados de dichos autoanticuerpos

I. MATERIALES Y MÉTODOS

20 Pacientes

1. Pacientes con SAF y controles

Participaron en el estudio 43 pacientes [44 ± 11 años (media ± desviación estándar (DE)), 39 mujeres y 4 varones] a los que se les había diagnosticado síndrome antifosfolípido (SAF), de acuerdo con los criterios diagnósticos internacionales [Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. Arthritis

25
30

Rheum. 1999; 42:1309-11; Brandt JT, Barna LK, Triplett DA. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. On behalf of the
5 Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH. Thromb Haemost. 1995;74:1597-603]
entre febrero de 1998 y marzo de 2002. Todos los pacientes fueron identificados por tener anticoagulante
lúpico (ACL) y una historia personal de trombosis venosa
10 (n = 17), trombosis arterial (n = 13, de los cuales 4 con infarto agudo de miocardio (IAM), 7 con enfermedad trombótica cerebrovascular (ETCV), y 2 en otras regiones) o ambos [n = 13 teniendo todos ellos trombosis venosa profunda más ETCV (n = 8), IAM (n = 1), ETCV más IAM (n =
15 3) o trombosis arterial en la región mesentérica (n = 1)]. A 27 de dichos pacientes se les diagnosticó un lupus eritematoso sistémico (LES). Se obtuvieron muestras de suero durante el tiempo en el cual el ACL era positivo y por lo menos 3 meses después del último episodio
20 trombótico y se almacenaron a -80°C hasta que fueron estudiadas para detectar autoanticuerpos anti-EPCR.

Como grupo control se incluyeron en el estudio 43 voluntarios sanos sin historia de trombosis ni ACL. Todos los pacientes y controles habían dado su consentimiento
25 informado para la participación en el estudio.

2. Mujeres con muerte fetal y controles

Se realizó un estudio caso-control pareado sobre muerte fetal. Se han considerado 87 mujeres, de 19 a 31
30 años de edad (edad media: 27 años), incluidas en el estudio entre septiembre de 1996 y septiembre de 2002 por

un primer episodio de muerte fetal en la décima semana de amenorrea que había ocurrido durante su último embarazo. Se excluyeron mujeres con algún antecedente trombótico, enfermedades infecciosas crónicas, o con alguna enfermedad sistémica conocida, diabetes mellitus o con antecedentes de otro tipo de patología de la gestación (aborto espontáneo, eclampsia, restricción de crecimiento fetal intrauterino), así como los casos de muerte fetal debidos a alguna anomalía cromosómica en el cariotipo o malformación morfológica en el feto. La muerte fetal había ocurrido durante el primer embarazo en 58 mujeres, durante el segundo en 21 mujeres y durante el tercero en las 8 mujeres restantes; en 75 mujeres entre las semanas 10 y 22 y en las 12 mujeres restantes entre las semanas 22 y 36 (valor medio: 17 semanas).

Un grupo control de 87 madres sanas, agrupadas por edad, número de embarazos y tiempo transcurrido desde el final del último embarazo, todas ellas cumplieron todos los criterios de exclusión que el grupo de mujeres con muerte fetal, fueron reclutadas concomitantemente durante el mismo periodo de tiempo, entre mujeres asistidas como pacientes externas en el Departamento de Ginecología del mismo hospital, para un examen médico sistemático.

El estudio fue aprobado por los comités de ética de la institución de los inventores y se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes. La inclusión de los pacientes y controles, el consentimiento informado y la recolección de muestras de sangre tuvo lugar por lo menos 6 meses (6-12 meses) después de la muerte fetal. Las muestras de sangre fueron recogidas, procesadas y almacenadas a -80°C , de acuerdo con los

procedimientos convencionales. Los procedimientos de recogida fueron idénticos en todos los casos y en los controles.

5 Expresión de EPCR humano soluble recombinante

Para expresar el EPCR humano recombinante en forma soluble (rhsePCR), se ha amplificado la secuencia del EPCR humano soluble (hsePCR), que comprende el dominio extracelular sin su péptido señal ni los dominios de transmembrana e intracelular (residuos 1-139, numeración correspondiente a la forma madura de la proteína después del procesamiento del péptido señal) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores

SEQ ID NO: 1 y

15 SEQ ID NO: 2,

que añadían un sitio de restricción ClaI y otro NotI en los extremos 5' y 3' respectivamente, utilizando como molde cDNA de células endoteliales. Estas modificaciones permitieron ligar la secuencia de rhsePCR a los sitios ClaI y NotI del plásmido pPICZαC (Stratagene, La Jolla, CA) a continuación de la señal de secreción del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* que permite la secreción eficiente de muchas proteínas al medio extracelular desde el interior de levaduras.

25 El inserto se clonó en fase de lectura con un epítipo c-myc y una etiqueta de 6 histidinas presentes en dicho vector pPICZαC. Debido al proceso de clonaje se añadieron un resto de serina y otro de isoleucina en el extremo amino del rhsePCR el cual se expresa fusionado, 30 en su extremo carboxi terminal, a una cola que contiene el epítipo c-myc y 6 histidinas para facilitar su

purificación y el anclaje del rhsEPCR al fondo de los pocillos de la microplaca mediante un anticuerpo monoclonal anti c-myc. Mediante secuenciación directa se comprobó que la secuencia del inserto y del vector era la
5 correcta. La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia del rhsEPCR obtenido, deducida a partir de la secuencia de DNA, que comprende los residuos añadidos por la técnica de clonaje empleada, los residuos de la región extracelular del rhsEPCR humano, el epítipo c-myc, y la
10 cola de 6 histidinas.

Con el vector de expresión previamente preparado y tras linearización del mismo con la enzima de restricción PmeI, se transformaron células de *Pichia pastoris* mediante un método químico (Easy Comp, Invitrogen), dando
15 como resultado la integración, mediante recombinación homóloga, de la secuencia codificante de rhsEPCR en el promotor endógeno de respuesta a metanol. El producto de la transformación se cultivó en presencia de zeocina para seleccionar aquellas colonias de *P. pastoris*
20 transformadas con el vector que contenía la secuencia codificante del rhsEPCR que a su vez contiene el gen de la resistencia a la zeocina. Brevemente, las levaduras transformadas se cultivaron en 4 ml de medio BMY [1% de (p/v) de extracto de levadura, 2% (p/v) de peptona, 25 fosfato potásico 100 mM (pH 6,0), 1,34% (p/v) de fuente de nitrógeno de levaduras con sulfato amónico, 4x10⁻⁵% (p/v) de biotina] suplementado con 1% (v/v) de glicerol (BMGY) y se incubaron a 28-30°C durante unas 18 horas con agitación. Las células se recogieron por centrifugación a
30 2.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y se procedió a inducir la

expresión de rhsEPCR con metanol al 1% durante 18 horas. Para ello, las células se resuspendieron en 3 ml de BMY suplementado con 0,5% (p/v) de metanol y se incubaron durante 18 horas a 28-30°C aproximadamente con agitación
5 vigorosa. Tras la inducción, las muestras procedentes del medio condicionado se cargaron en geles de NuPAGE Bis-Tris al 12% (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el rhsEPCR se detectó mediante Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-myc (Invitrogen). Para la producción a
10 gran escala se seleccionó la colonia que secretó la concentración más alta de rhsEPCR. En las colonias seleccionadas por su alta capacidad de producción de rhsEPCR se estudió el metabolismo del metanol (metabolizador rápido o lento) de las colonias, lo que
15 permitió establecer las condiciones óptimas de expresión para la colonia más adecuada. Una vez optimizadas las condiciones de cultivo e inducción con metanol, se aumentó la escala para producir grandes cantidades de rhsEPCR.

20

Purificación del sEPCR recombinante

Dado que *P. pastoris* secreta muy pocas proteínas al medio, un alto porcentaje de las proteínas halladas en el medio de cultivo corresponden a rhsEPCR, lo cual
25 simplificó considerablemente su purificación. Brevemente, el rhsEPCR fue purificado a partir de los sobrenadantes de los cultivos de levadura mediante un proceso de purificación en 3 pasos que comprendía cromatografía de afinidad metálica, intercambio aniónico y cromatografía
30 de filtración en gel. Para ello, el sobrenadante del cultivo se concentró y dializó frente a fosfato sódico

100 mM, NaCl 10 mM, pH 7,6 y, a continuación, se sometió a cromatografía de afinidad metálica en una columna de 5 ml Hitrap (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) cargada con cobre. La fracción que se unió a la
5 columna se eluyó con un tampón que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se dializó frente a Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) sin NaCl, y, a continuación, se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico en una columna Resource Q column (Amersham Biosciences) y
10 elución con un gradiente 0,0-300 mM de NaCl en un volumen equivalente al de 20 columnas. Las fracciones eluidas que contenían el rhSEPCR se reunieron y concentraron mediante ultrafiltración centrífuga y, a continuación, se aplicaron a una columna Superdex 75-HR10/30 (Amersham
15 Biosciences) para efectuar la filtración en gel. La concentración de proteína purificada se determinó utilizando el ensayo de proteína total BCA (Pierre, Rockford, IL) y patrones de albúmina sérica bovina (BSA). Para detectar el rhSEPCR purificado, las muestras se
20 cargaron en geles al 12% de NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se realizó una electroforesis en condiciones reductoras seguido de tinción con azul de Coomassie. Un gel de electroforesis se sometió a *electroblotting* y el rhSEPCR fue detectado con el
25 anticuerpo monoclonal anti-myc (Invitrogen). Para estimar el peso molecular del rhSEPCR se utilizó un patrón de peso molecular incluido en cada gel de electroforesis.

ELISA para la determinación de autoanticuerpos anti-EPCR en suero o plasma

Se determinaron por separado los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG, IgA o IgM, por ser éstos los encontrados con mayor frecuencia en los
5 pacientes con alteraciones autoinmunes en los que se detectan anticuerpos dirigidos frente a alguna de sus propias estructuras (autoanticuerpos).

En los tres casos se tapizaron microplacas de 96
10 pocillos (Costar, Acton, MA, EEUU) con 100 µl/pocillo de un anticuerpo monoclonal anti-c-myc (Invitrogen, EEUU) a 1,5 µg/ml en una solución de Na₂CO₃ a 100 mmol/l, pH 9,6, durante la noche a 4°C. Este anticuerpo es utilizado como anticuerpo de captura y está dirigido hacia la etiqueta
15 c-myc añadida y presente en el rhsePCR. De este modo, el rhsePCR es anclado al pocillo preservando sus epítomos extracelulares. Después del lavado con TB (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, 0,05% de Tween-20, pH 7,4), los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con 3% (p/v) de
20 BSA en TB a temperatura ambiente (TA) durante 4,5 horas. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de una solución que contenía 3µg/ml de rhsePCR en TB suplementado con 1% de BSA (TB1) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. En
25 paralelo se incubaron pocillos blanco con TB1 sin rhsePCR. Después del lavado con TB se añadieron a cada pocillo 100 µl de una dilución de la muestra 1:100 (plasma o suero) en TB1 y se incubaron durante la noche a 4°C. A continuación, los pocillos fueron lavados con TB,
30 y los autoanticuerpos anti-EPCR que permanecieron unidos al fondo del pocillo fueron detectados bien con un

anticuerpo policlonal murino anti-IgA humana conjugado con peroxidasa (Biotrend), bien con un anticuerpo policlonal murino anti-IgM humana conjugado con peroxidasa (Zymed) o bien con un anticuerpo policlonal murino anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed). Después de un periodo de 2 horas de incubación a temperatura ambiente con agitación suave se realizó un lavado.

Para determinar los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgA o IgM, se añadieron 100 μ l de una solución 0,4 mg/ml de o-fenilendiamina (Kodak) que contenía Na_2HPO_4 0,07 M, citrato de sodio 0,04 M y 0,02 % (v/v) de H_2O_2 , pH 5,0. Después de un tiempo de revelado de 5 y 8 minutos en oscuridad para IgA e IgM, respectivamente, se añadieron 100 μ l de H_2SO_4 para detener la reacción y 5 minutos después se leyeron las absorbancias a 492 nm en un lector de microplaca (iEMS REader, Labsystems, Finlandia).

En la placa empleada para medir autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG se añadieron 100 μ l de una solución 1 ng/ml de 4-nitrofenil fosfatasa (Sigma) en dietanolamina 0,1 M, pH 10,3. Después de 15 minutos, la reacción fue detenida con 100 μ l de NaOH 1 M y la absorbancia leída después de la estabilización del color a 405 nm en el lector de microplaca (iEMS REader). Todas las muestras fueron ensayadas al menos dos veces en diferentes ensayos.

Para asegurar que todas las absorbancias medidas en cada placa caían en un rango lineal, se construyó, para cada isotipo, una curva usando diluciones seriadas de la muestra cuya absorbancia fue la más alta registrada. Para

permitir comparaciones entre placas, se eligió una muestra para ensayar en cada placa (muestra patrón) lo que permitía introducir un factor de corrección. Las unidades arbitrarias (UA) fueron definidas de la siguiente manera: para cada muestra paciente (muestra problema) la absorbancia específica se calculó sustrayendo la absorbancia de los pocillos blanco y, a continuación, multiplicando por 1.000 y por un factor de corrección correspondiente a la relación entre la absorbancia específica de la muestra patrón ensayada en una placa dada (placa de referencia) y en la placa donde la muestra problema es ensayada. Los coeficientes de variación inter e intra-ensayo fueron evaluados con el uso de cinco muestras probadas cinco veces para el coeficiente de variación inter-ensayo (menor de 5%) y en tres ocasiones diferentes para calcular el coeficiente de variación inter-ensayo (menor de 10%).

Generación de PCA en células endoteliales cultivadas

La línea celular utilizada fue EA.hy926, una línea de células endoteliales humanas transformada que ha retenido la capacidad de expresar trombomodulina y EPCR (Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:10212-6). Se incubaron 5×10^4 células por pocillo de una placa de 96 pocillos con 0,02 U/ml de trombina (0,17 nM) (ERL, Swansea, Reino Unido) y concentraciones crecientes de PC (Baxter, Deerfield, IL, USA) oscilando entre 50 y 1.000 nM en tampón Tris 20 mM, pH 7,4,

suplementado con NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 0,6 mM, 1% de BSA, 0,001% de Tween-20 y 0,02% de NaN₃. Después de 45 minutos a temperatura ambiente se añadió lepirudina (Schering AG, Berlin, Germany) a una concentración final de 0,2 µmol/l, para inhibir la trombina y 3-4 minutos después se añadió el sustrato cromogénico S-2366 (Chromogenix, Milan, Italy) a una concentración final de 0,4 mM con el objeto de monitorizar su proteólisis por la PCA. El incremento en la absorbancia a 405 nm fue registrado cinéticamente en un lector de microplaca (iEMS REader, Labsystems, Finlandia). El ajuste de los datos de la curva a la ecuación de Michaelis-Menten fue realizado usando el programa Enzfitter (Biosoft, Cambridge, Reino Unido) que calculó el valor de la Km de la activación de la PC bajo esas condiciones. Donde fue necesario, se añadieron 45 µg/ml de autoanticuerpos anti-EPCR purificados de pacientes (véase más abajo) simultáneamente con la trombina y la PC. Así, el efecto de los autoanticuerpos anti-EPCR sobre la activación de la PC podría ser analizado.

Purificación de anticuerpos anti-EPCR

1. Purificación de anticuerpos IgM

Muestras de suero de 1 ml que contenían autoanticuerpos anti-EPCR fueron diluidas en tampón fosfato salino (PBS) (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 0,15 M, pH=7,4) y pasadas a través de un filtro de 0,45 µm. El filtrado fue aplicado a una columna HitTrap activada por NHS HP (Amersham Biosciences) donde previamente se había inmovilizado un anticuerpo monoclonal murino anti-IgM humana (Maruyama S, Kubagawa H, Cooper MD. Activation of

human B cells and inhibition of their terminal differentiation by monoclonal anti-murine antibodies. J Immunol. 1985; 135:192-9). La IgM humana fue eluída con 5 ml de glicina 0,1 M, pH 2,5 y recogida en 100 μ l de Tris 1 M, pH 9,0. La fracción que contenía la IgM humana fue concentrada y dializada frente a TB suplementado con CaCl_2 5 mM y MgCl_2 0,6 mM, pH 7,4.

10

2. Purificación de anticuerpos IgA

Muestras de 1 ml de suero fueron diluidas en PBS y aplicadas manualmente a una columna de jacalina (Pierce). La fracción adsorbida fue eluída con 2 ml de melibiosa 0,1 M en PBS y subsiguientemente dializada frente a PBS. Puesto que fueron necesarios pasos posteriores de purificación, las muestras fueron aplicadas a una columna de afinidad HiTrap Protein G HP (Amersham Biosciences) para retirar la IgG contaminante. El producto no ligado que contenía la fracción IgA fue dializado frente a KH_2PO_4 50 mM, pH 7,0, y finalmente aplicado a una columna de afinidad HiTrap Blue HP (Amersham Pharmacia Biotech) para retirar la albúmina. El material no ligado que contenía la fracción de IgA purificada fue recogido y dializado frente a tampón TB suplementado con CaCl_2 5 mM y MgCl_2 0,6 mM, pH 7,4.

3. Purificación de anticuerpos IgG

Muestras de suero de 1 ml que contenían autoanticuerpos anti-EPCR fueron diluidas en tampón fosfato salino (PBS) (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 0,15

M, pH=7,4) y pasadas a través de un filtro de 0,45 μ m. El filtrado fue aplicado a una columna HitTrap Protein G HP (Amersham Biosciences). La IgG humana fue eluída con 5 ml de glicina 0,1 M, pH 2,5 y recogida en 100 μ l de Tris 1 M, pH 9,0. La fracción que contenía la IgM humana fue concentrada y dializada frente a TB suplementado con CaCl_2 5 mM y MgCl_2 0,6 mM, pH 7,4.

Preparación de una columna de afinidad rhsePCR

10 El rhsePCR (2 mg en 3 ml de NaHCO_3 100 mM, pH 8,5) fue unido a una columna de afinidad HitTrap NHS-activated HP (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de que la reacción hubiera sido detenida con glicina 0,1 M, la columna de rhsePCR fue
15 lavada extensamente con NaCl 2 M. De esta manera, la columna de rhsePCR era capaz de ligar PC en TBS, pH 7,4, suplementado con CaCl_2 20 mM y MgCl_2 0,6 mM. La PC podía ser eluída de la columna con TBS suplementado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (datos no mostrados).
20 Puesto que el rhsePCR ligado a la columna mantenía su capacidad para unirse a la PC, seguramente debería retener la conformación nativa y los epítomos reconocidos por los autoanticuerpos. Por tanto, la columna así preparada era adecuada para eliminar autoanticuerpos
25 anti-EPCR a partir de una muestra de suero o plasma.

Métodos estadísticos

En el estudio de casos y controles de SAF, la comparación entre pacientes (casos) y controles para la
30 frecuencia de niveles elevados de anticuerpos anti-EPCR IgM, IgA e IgG fue realizado según el test de la chi-

cuadrado. La "odds ratio" (OR) (Martínez-González MA, de Irala-Estevez J & Guillén Grima F, (1999), ¿Qué es una odds ratio?, Medicina Clínica, 112, 11:416-422) y el intervalo de confianza del 95% se calcularon como una
5 medida de la asociación entre SAF y autoanticuerpos anti-EPCR.

En el estudio de pareado de casos y controles de muerte fetal, la comparación entre casos y controles para variables continuas y por categorías fue realizada según
10 el test-t para muestras pareadas y con el test McNemar, respectivamente. La asociación entre los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgG e IgM con el ACL y con anticuerpos anti-cardiolipina de isotipo IgM se evaluó con coeficientes de correlación para variables
15 continuas y con el test de Mann-Whitney para variables por categorías.

Para evaluar el riesgo de muerte fetal asociado con altos niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgG e IgM, se utilizó un análisis de regresión múltiple
20 con pares de casos y controles. Las principales variables independientes fueron los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgG e IgM por categorías, de acuerdo con la distribución de esas inmunoglobulinas en los controles. Se utilizaron diferentes puntos de corte
25 (cut-off) para determinar los niveles asociados con un riesgo más alto. Se realizaron análisis univariados y multivariados, ajustando por factores de riesgo de muerte fetal conocidos. No fue posible incluir en el modelo completo los factores V Leiden (FVL) y ACL por lo que se
30 consideraron entonces dos modelos para ensayar el efecto de autoanticuerpos anti-EPCR:

(1) introduciendo simultáneamente los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR isotipos IgM e IgG, anticuerpo anti-cardiolipina de isotipo IgM, ACL y protrombina G20210A, y

5 (2) igual que el modelo 1, pero ajustando por la presencia/ausencia de FVL, en lugar de ACL.

El modelo (1) fue usado para evaluar la hipótesis de que los anticuerpos anti-cardiolipina y el ACL eran marcadores, más que factores etiológicos, de un estado
10 protrómbico causado por autoanticuerpos anti-EPCR. Todos los cálculos fueron realizados con SPSS, versión 10.0 (SPSS Inc.).

II. RESULTADOS

15 Con el objeto de poder investigar la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR en plasma y suero, en primer lugar se produjo rhEPCR usando el sistema de expresión de la levadura *P. pastoris*. Usando el protocolo descrito, se pudo purificar de un cultivo de *P. pastoris* más de 5
20 mg de rhEPCR. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y análisis Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-myc, el rhEPCR aparecía como una banda única y ligeramente heterogénea reflejando los distintos grados
25 de glicosilación, tal como se había descrito previamente (Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. J Biol Chem.
30 1996;271:17491-8) [véase la Figura 1].

El rhsePCR fue capaz de inhibir la actividad anticoagulante de la PCA en un ensayo de coagulación, tal como se ha descrito previamente (Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica J, Fukudome K, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors. J Biol Chem. 1996;271:17499-503) (datos no mostrados). Además de unir la PC con la afinidad esperada (véase más abajo), la activación de la PC por trombina sobre la superficie de las células endoteliales estaba caracterizada por una K_m de 51 ± 10 nM. La activación disminuyó considerablemente en presencia de rhsePCR $2 \mu M$ ($K_m = 1.000$ nM aproximadamente), lo que significa una K_i de 70 nM aproximadamente, sugiriendo que el rhsePCR se une a la PC con una eficiencia similar a la del EPCR nativo, tal como ha sido descrito previamente (Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. J Biol Chem. 1996;271:17491-8; Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica J, Fukudome K, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors. J Biol Chem. 1996;271:17499-503). Estas evidencias sugieren fuertemente la correcta actividad y conformación del rhsePCR, lo que permite utilizarlo para detectar anticuerpos contra EPCR humano.

Autoanticuerpos anti-EPCR en pacientes con SAF

Considerando niveles altos a aquellos superiores al percentil 97 de cada grupo control, los niveles altos de autoanticuerpo anti-EPCR isotipos IgM, IgA o IgG
5 estuvieron asociados con SAF [OR = 4,47; IC 95%: 1,15-17,40] Como se muestra en la Tabla 1. Los niveles extremadamente elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, como se observa en la figura 2, se detectaron únicamente en sujetos diagnosticados de SAF: tres pacientes
10 mostraron un nivel muy alto de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM (paciente A = 407 UA, paciente B = 301 UA y paciente C = 293 UA), dos pacientes con SAF mostraron unos niveles muy altos de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgA (paciente D = 795 UA y paciente B = 475 UA,
15 quien también mostró altos niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM) y dos niveles altos de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG (paciente E = 230 UA y paciente F = 220 UA). Los seis pacientes fueron mujeres con historia previa de trombosis, uno de los
20 criterios de selección (ictus en pacientes A, C, D y F; enfermedad cardiovascular en paciente E, trombosis venosa en pacientes A, B, D y F). Lo más interesante es el hecho de que todas las mujeres que portaban autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgM e IgA menos la paciente B, que
25 no fue evaluable, sufrieron múltiples episodios de muerte fetal.

Debido a este hallazgo se enfocó el análisis sobre la posible asociación entre autoanticuerpos anti-EPCR y muerte fetal.

Tabla 1

OR de SAF asociado con anticuerpos anti -EPCR

Autoanticuerpos anti-EPCR (percentil superior al 97%)	SAF (n = 43)	Control (n = 43)	OR (IC 95%)
IgG		1	3,10 (0,30-31,50)
IgM	6	1	6,80 (0,80-59)
IgA	3	1	3,10 (0,30-31,50)
IgG + IgM + IgA	11	3	4,47 (1,15-17,4)

Caracterización bioquímica de anticuerpos anti-EPCR

- 5 Las fracciones de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM, IgA e IgG de los pacientes con niveles extremadamente elevados fueron purificadas a partir de 1 ml de suero. La fracción de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM del paciente C fue capaz de disminuir la
- 10 generación de PCA por células endoteliales cultivadas en presencia de trombina (20% de la capacidad residual de activaciones de la PC, $p = 0.02$). El efecto inhibitorio era dependiente de la dosis. Para demostrar que este efecto de la fracción de autoanticuerpos anti-EPCR de
- 15 isotipo IgM del paciente con SAF era debida a un anticuerpo específico frente a EPCR, la muestra fue desprovista por completo de autoanticuerpo anti-EPCR específico cargándola en una columna de afinidad donde el rhSEPCR fue inmovilizado. La fracción obtenida en tal
- 20 forma perdió la capacidad inhibitoria sobre la generación de PCA (87,6% de generación de PC) lo que significa que

el responsable de ese fenómeno tenía que ser un autoanticuerpo anti-EPCR específico. Ninguna de las otras fracciones purificadas a partir de pacientes con SAF fueron capaces de modificar la capacidad de las células endoteliales de generar PCA (Figura 3).

Autoanticuerpos anti-EPCR en mujeres con muerte fetal

Las frecuencias de factores de riesgo previamente relacionados con la muerte fetal y de los anticuerpos anti-EPCR en el grupo de pacientes y controles estudiado se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

ORs univariantes y sus intervalos de confianza para muerte fetal asociada con las diferentes variables estudiadas

	Muerte fetal (n=87)	Controles (n=87)	OR pareadas	IC 95%	p
Anti-EPCR IgM	16	3	14,0	(1,8- 106,4)	0,01
Anti-EPCR IgG	13	4	4,3	(1,2- 15,2)	0,02
Factor V Leiden	6	1	6,0	(0,7- 49,8)	0,1
Protrombina G20210A	3	1	3,0	(0,3- 28,8)	0,34
ACL	7	1	7,0	(0,9- 56,9)	0,07
Anticardiolipina IgM	9	2	5,0	(1,1- 22,8)	0,04

Anticardiolipina IgG	1	0	-	-	-
----------------------	---	---	---	---	---

El percentil del 95% de los niveles de autoanticuerpo anti-EPCR de isotipo IgM en el grupo control fue de 99 UA. De los 87 pacientes, 16 pacientes (18%) tuvieron valores que excedieron este punto de corte frente a los 3 sujetos del grupo control ($n = 87$). La OR no ajustada para muerte fetal en pacientes con niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM superior al percentil del 95% comparados con aquéllas que tuvieron un valor más bajo, fue de 14 (intervalo de confianza (IC) de 95%, 1,8 a 106,4). Cuando el punto de corte fue colocado en el percentil del 90% (83 UA), la OR fue de 5,2 (IC 95%, 1,8 a 15,3).

El percentil 95 de los niveles de autoanticuerpo anti-EPCR de isotipo IgG en el grupo control fue de 94 UA. De los 87 pacientes, 13 pacientes (15%) tuvieron valores que excedieron ese punto de corte frente a los 4 sujetos del grupo control. La OR no ajustada para muerte fetal en pacientes con autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG superior a un percentil del 95% fue de 4,3 (IC 95%, 1,2 a 15,2). Cuando el punto de corte se colocó en el percentil del 90% (88,4 UA), la OR era de 2,3 (IC 95%, 0,9 a 5,6).

Adicionalmente, se ha realizado un análisis multivariado ajustando por potenciales factores de confusión. Como se indicó anteriormente, fue imposible incluir el FVL y el ACL en el mismo modelo multivariado por lo que se consideraron dos modelos diferentes: Modelo (1), ajustado por anticuerpos antifosfolípido (es decir,

anticuerpos ACL y anticardiolipina) y protrombina G20210A y el Modelo (2), en el que se incluyó el FVL pero no el ACL. La OR asociada con autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM superior al percentil 95 en el Modelo (1) fue de 23,1 (IC 95%, 2 a 266,3) y en el Modelo (2) de 31,0 (IC 95%, 2 a 384,3). La OR asociada con autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG superior al percentil 95 en el Modelo (1) fue de 6,8 (IC 95%, 1,2 a 38,4). De acuerdo con el Modelo (2), que incluye el factor V de Leiden en lugar del ACL, la OR asociada con autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG superior al percentil 95 era de 11,0 (IC 95%, 1,6 a 73,5). Los resultados se recogen en la Tabla 3.

15

Tabla 3

ORs multivariadas y sus intervalos de confianza del 95% para muerte fetal asociada con los niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR

Autoanticuerpos anti-EPCR	Modelo 1			Modelo 2		
	OD pareada	IC 95%	p*	OD pareada	IC 95%	p*
Anti-EPCR IgM	23,0	2,0- 266,3	0,012	31,0	2,0- 384,3	0,007
Anti-EPCR IgG	6,8	1,2- 38,4	0,029	11,0	1,6- 73,5	0,013

20

Estos resultados indican que los autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgM e IgG son factores de riesgo independientes para la muerte fetal. Sin embargo los niveles elevados de IgA no se asociaron de manera

significativa con la muerte fetal en este grupo de mujeres estudiado.

III. DISCUSIÓN

5 Se ha implementado un método, en particular, un ELISA, que permite detectar la presencia de autoanticuerpos frente a EPCR humano. Utilizando este sistema se ha estudiado un grupo de pacientes con SAF caracterizado por trombosis y ACL y se ha demostrado, por
10 primera vez en patología humana, la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR específicos, de isotipos IgM, IgG e IgA. Se ha estudiado el subgrupo de pacientes con SAF con ACL porque ha sido relacionado con un mayor riesgo de trombosis, y, por ello, se pensó que sería un
15 grupo con elevada probabilidad de presentar autoanticuerpos directamente relacionados con la manifestación clínica. De hecho, se han encontrado numerosos pacientes con un nivel muy elevado de autoanticuerpos anti-EPCR.

20 Estos autoanticuerpos podrían proporcionar una explicación para la trombosis y pérdida de embarazo en pacientes con SAF. En primer lugar, el EPCR es una molécula que se expresa en el endotelio de los vasos sanguíneos grandes y en el trofoblasto. Las
25 inmunoglobulinas IgM e IgG pueden fijar y activar el complemento, si estos anticuerpos se dirigen contra EPCR podrían activar el complemento en el endotelio y lesionarlo promoviendo la trombosis a ese nivel. En segundo lugar, se ha demostrado que la fracción de IgM de
30 un paciente con elevados niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM puede reducir seriamente la

generación de PCA por células endoteliales en presencia de trombina. Este efecto inhibitorio desaparece cuando se elimina específicamente la IgM dirigida contra EPCR mediante el paso del conjunto de la fracción de IgM a través de una columna de afinidad por EPCR, lo que significa que el efecto inhibitorio es debido al autoanticuerpo anti-EPCR de isotipo IgM.. Este anticuerpo conduciría probablemente a un bajo nivel de PCA *in vivo*, lo cual es, en sí mismo, un fuerte factor de riesgo de trombosis.

Al seleccionar los pacientes según el criterio de trombosis venosa y/o arterial no se pudo evaluar el riesgo de trombosis asociada con los autoanticuerpos anti-EPCR. Por el contrario, se pudo detectar un mayor nivel de autoanticuerpos anti-EPCR, particularmente del isotipo IgM, en mujeres con historia previa de muerte fetal que en mujeres sin ella. A la vista de dichos resultados en el estudio piloto se decidió llevar a cabo un estudio pareado de casos y controles para evaluar el riesgo de primer episodio de muerte fetal inexplicable en una población general de mujeres asociado con la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR. Se ha encontrado que un elevado nivel de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM (definido como un valor superior al percentil 95 de la distribución de valores en sujetos control) era un fuerte factor de riesgo para los primeros episodios de muerte fetal, con un riesgo relativo de 23 ó 31 comparado con los niveles inferiores. Niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG constituían también un fuerte factor de riesgo, pero más débil que el del isotipo IgM, con un riesgo relativo de 7 u 11

dependiendo del modelo matemático utilizado. En el análisis univariado, el ACL y el anticuerpo anticardiolipina de isotipo IgM fueron asociados con un mayor riesgo de muerte fetal pero dicha asociación fue
5 atenuada en el modelo multivariado debido, quizás, a que la información dada por los anticuerpos antifosfolípido clásicos es debida a los autoanticuerpos anti-EPCR asociados, que podrían ser un factor etiológico de muerte fetal más que un mero marcador de riesgo. Asimismo, se
10 estudió la presencia de FVL y protrombina G20210A, que han sido recientemente asociadas con un mayor riesgo de muerte fetal tardía, encontrándose un mayor riesgo tanto en el análisis univariado como multivariado asociado con ese polimorfismo, pero el riesgo no era estadísticamente
15 significativo, probablemente debido al número de pacientes incluidos en el estudio.

En conclusión, este estudio pone de manifiesto, por primera vez, la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR en pacientes con SAF y trombosis. La presencia de
20 autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgM e IgG aumenta el factor de riesgo del primer episodio de muerte fetal. Estos autoanticuerpos pueden por sí mismos contribuir a la trombosis y a la muerte fetal que ocurre en el SAF y en la población general.

25

EJEMPLO 2

Detección de autoanticuerpos anti-EPCR en mujeres con infarto de miocardio

30 Grupo de estudio: 142 mujeres (edad, 39±5 años, media±desviación típica) con infarto de miocardio y 142

5 mujeres sanas (edad, 39 ± 5 años) emparejadas por edad y procedencia geográfica. Se estudiaron los factores de riesgo clásicos de infarto de miocardio (hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, consumo de tabaco y consumo de anticonceptivos orales). Se determinaron los autoanticuerpos anti-EPCR IgG, IgM e IgA en muestras de plasma siguiendo el protocolo del ensayo ELISA descrito en el apartado "Materiales y Métodos" (Ejemplo 1).

10 Resultados: Los niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, considerados estos como valores por encima del percentil 93 de la distribución de los niveles de anticuerpos anti-EPCR en el grupo control, se asociaron con un aumento del riesgo del infarto. En el análisis multivariado los niveles elevados de anticuerpos anti-EPCR se asociaron con una Odds ratio ajustada (OR) de 3,5 con un intervalo de confianza al 95% (IC 95%) de 1,4-8,9 para la IgA, en el caso de la IgM OR = 3,0; IC 95%: 1,2-7,5.

20 Conclusión: Los niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR son un factor de riesgo independiente de infarto de miocardio en mujeres.

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en una muestra, caracterizado porque comprende la cuantificación *in vitro* de autoanticuerpos frente al EPCR en dicha muestra procedente de un sujeto.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR se relacionan con una patología seleccionada entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y complicaciones obstétricas.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad autoinmune está seleccionada entre síndrome antifosfolípidos, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y vasculitis autoinmunes.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad vascular está seleccionada entre enfermedad vascular arterial, enfermedad vascular venosa y trombosis de la microcirculación.
5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha enfermedad vascular está seleccionada entre infarto de miocardio, ictus cerebral, accidente cerebral transitorio, isquemia de extremidades, aterosclerosis, aneurisma, trombosis, trombosis venosa superficial, trombosis venosa profunda, y embolia pulmonar.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha complicación obstétrica está seleccionada entre aborto, muerte fetal, nacimiento prematuro, retraso del crecimiento intrauterino, eclampsia o pre-eclampsia.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicha muestra es una muestra de suero o plasma.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque dicho sujeto es un ser humano.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la cuantificación de dichos autoanticuerpos anti-EPCR se realiza mediante un ensayo inmunológico acoplado a un marcador.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la cuantificación de dichos autoanticuerpos anti-EPCR se realiza mediante un ELISA que comprende:
- a) inmovilizar en un soporte sólido un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR;
 - b) incubar dicho polipéptido inmovilizado con una muestra sospechosa de contener autoanticuerpos anti-EPCR procedente de dicho sujeto durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión de

dichos anticuerpos al polipéptido inmovilizado y la formación de complejos polipéptido-autoanticuerpo anti-EPCR;

5 c) retirar la muestra no unida a dicho polipéptido inmovilizado;

d) incubar dichos complejos polipéptido-autoanticuerpo anti-EPCR con un segundo anticuerpo conjugado a una enzima, en donde dicho segundo anticuerpo es un
10 anticuerpo capaz de unirse a dichos autoanticuerpos anti-EPCR.

11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho polipéptido está seleccionado entre:

- un polipéptido que comprende la secuencia de
15 aminoácidos del EPCR en su longitud completa, y

- un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento del EPCR que contiene, al menos, un epítipo susceptible
20 de ser reconocido por un anticuerpo anti-EPCR.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado porque dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende:

25 (i) una región A constituida por un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido
30 por un anticuerpo anti-EPCR, y

- (ii) una región B constituida por un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión y/o una secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido.
- 5
13. Método según la reivindicación 12, caracterizado porque dicha región B está unida al extremo amino
- 10 terminal de dicha región A.
14. Método según la reivindicación 12, caracterizado porque dicha región B está unida al extremo carboxilo terminal de dicha región A.
15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizado porque dicha región A comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano.
16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizado porque dicha secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión y/o dicha secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido presente en dicha región B, comprende una secuencia de aminoácidos
- 25 seleccionada entre Arg-tag, His-tag, FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag,
- 30 proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, Ala-His-Gly-His-Arg-Pro (SEQ ID NO: 4) (2, 4 y 8

copias), Pro-Ile-His-Asp-His-Asp-His-Pro-His-Leu-Val-Ile-His-Ser, (SEQ ID NO: 5) Gly-Met-Thr-Cys-X-X-Cys (SEQ ID NO: 6) (6 repeticiones), β -galactosidasa, y VSV-glicoproteína.

- 5 17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, caracterizado porque dicha región B está constituida por un polipéptido que comprende un epítipo c-myc susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-c-myc y una cola de histidinas (His-tag).
- 10 tag).
18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, caracterizado porque dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano, una
- 15 secuencia de aminoácidos correspondiente al epítipo c-myc y una cola de histidinas (His-tag).
19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, caracterizado porque dicho polipéptido es una proteína de fusión que tiene la secuencia de
- 20 aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.
20. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo específico de isotipo de inmunoglobulinas y procede de una especie diferente a la procedencia de la
- 25 muestra que se analiza.
21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 20, caracterizado porque dicho segundo anticuerpo específico de isotipo de inmunoglobulinas se selecciona entre un anticuerpo anti-IgG humana, un
- 30 anticuerpo anti-IgM humana, un anticuerpo anti-IgA humana, y sus mezclas.

22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, caracterizado porque dicho segundo anticuerpo está conjugado a una enzima seleccionada entre peroxidasa y fosfatasa alcalina.
- 5 23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, caracterizado porque comprende además, la comparación del nivel de autoanticuerpos anti-EPCR determinado en la muestra, con los niveles normales.
- 10 24. Método según la reivindicación 1, caracterizado por determinar la variación de los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR en el tiempo.
- 15 25. Método según la reivindicación 24, caracterizado porque dicha muestra procede de un sujeto previamente diagnosticado de alguna enfermedad autoinmune o vascular, o que ha sufrido alguna complicación obstétrica, y que está sometido a tratamiento terapéutico.
- 20 26. Uso de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en un método para evaluar la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en una muestra.
- 25 27. Uso según la reivindicación 26, caracterizado porque dicha presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en una muestra se relaciona con una patología seleccionada entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y complicaciones obstétricas.
- 30 28. Uso de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) o un fragmento de la misma que

5 contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR, en un método para evaluar la presencia de niveles elevados de anticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en una muestra, caracterizado porque comprende la cuantificación *in vitro* de autoanticuerpos frente al EPCR en dicha muestra.

10 29. Uso según la reivindicación 28, caracterizado porque dicha presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR se relaciona con una patología seleccionada entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y complicaciones obstétricas.

15 30. Uso según la reivindicación 28, caracterizado porque dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende:

(i) una región A constituida por un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-EPCR, y

20

(ii) una región B constituida por un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión y/o una secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido.

25

30 31. Uso de un polipéptido según la reivindicación 30, caracterizado porque dicha región A comprende la

secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano.

32. Uso de un polipéptido según una de las reivindicaciones 30 o 31, caracterizado porque dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano, la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítipo c-myc y una cola de histidinas (His-tag).
33. Uso de un polipéptido según una de las reivindicaciones 30 a 32, caracterizado porque dicho polipéptido es una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.
34. Kit para evaluar *in vitro* la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en una muestra, caracterizado porque dicho kit comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR.
35. Kit según la reivindicación 34, caracterizado porque dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende:
- (i) una región A constituida por un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-EPCR, y

(ii) una región B constituida por un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión y/o una secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido.

36. Kit según la reivindicación 35, en el que dicha región A se caracteriza porque comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano.

37. Kit según una de las reivindicaciones 35 o 36, caracterizado porque dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano, la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítipo c-myc y una cola de histidinas (His-tag).

38. Kit según una de las reivindicaciones 35 a 37, caracterizado porque dicho polipéptido es una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

1/3

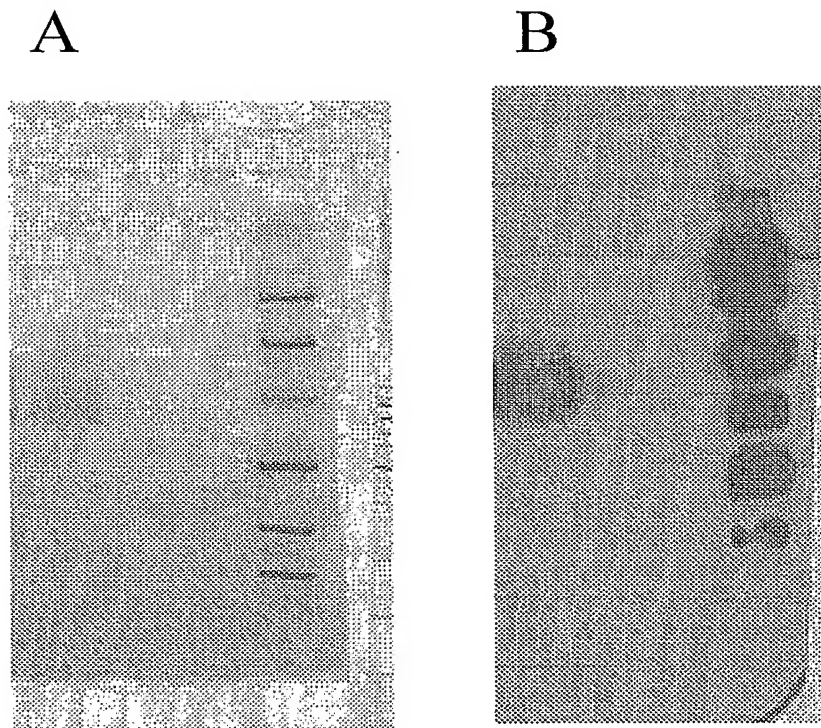


FIG. 1

2/3

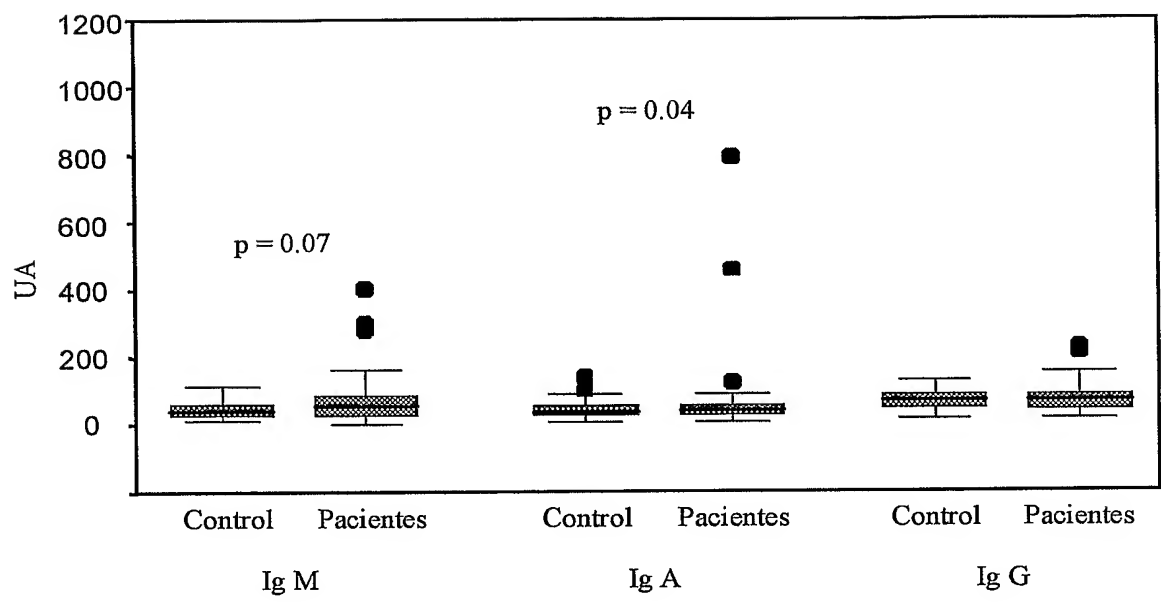


FIG. 2

3 / 3

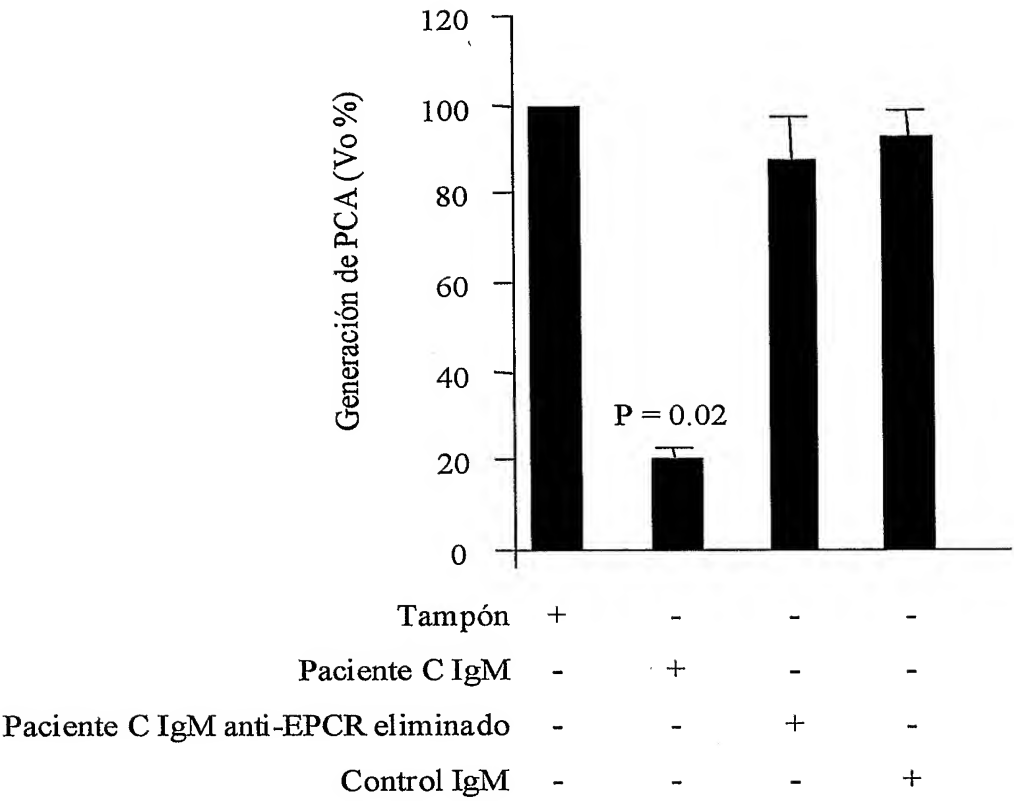


FIG. 3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Proyecto de Biomedicina CIMA, S.L.
- 5 <120> Método para evaluar el riesgo y la predisposición a desarrollar una patología relacionada con la presencia de autoanticuerpos frente al EPCR
- <160> 6
- 10 <170> PatentIn version 2.0
- <210> 1
- <211> 36
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <223> Oligonucleótido iniciador
- <400> 1
- 20 agcttggcat atcgattagc caagacgcct cagatg 36
- <210> 2
- <211> 36
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <223> Oligonucleótido iniciador
- <400> 2
- tattctatgc ggccgccgaa gtgtaggagc ggcttg 36
- 30

<210> 3

<211> 36

<212> PRT

5 <400> 3

Ser Ile Ser Gln Asp Ala Ser Asp Gly Leu Gln Arg Leu His Met
Leu

1

5

10

15

10 Gln Ile Ser Tyr Phe Arg Asp Pro Tyr His Val Trp Tyr Gln Gly
Asn

20

25

30

15 Ala Ser Leu Gly Gly His Leu Thr His Val Leu Glu Gly Pro Asp
Thr

35

40

45

Asn Thr Thr Ile Ile Gln Leu Gln Pro Leu Gln Glu Pro Glu Ser
Trp

20 50

55

60

Ala Arg Thr Gln Ser Gly Leu Gln Ser Tyr Leu Leu Gln Phe His
Gly

65

70

75

80

25

Leu Val Arg Leu Val His Gln Glu Arg Thr Leu Ala Phe Pro Leu
Thr

85

90

95

30 Ile Arg Cys Phe Leu Gly Cys Glu Leu Pro Pro Glu Gly Ser Arg
Ala

100

105

110

His Val Phe Phe Glu Val Ala Val Asn Gly Ser Ser Phe Val Ser
 Phe
 115 120 125

5 Arg Pro Glu Arg Ala Leu Trp Gln Ala Asp Thr Gln Val Thr Ser
 Gly
 130 135 140

Val Val Thr Phe Thr Leu Gln Gln Leu Asn Ala Tyr Asn Arg Thr
 10 Arg
 145 150 155
 160

Tyr Glu Leu Arg Glu Phe Leu Glu Asp Thr Cys Val Gln Tyr Val
 15 Gln
 165 170 175

Lys His Ile Ser Ala Glu Asn Thr Lys Gly Ser Gln Thr Ser Arg
 Ser
 20 180 185 190

Tyr Thr Ser Ala Ala Ala Ser Phe Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 Glu
 195 200 205

25 Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 210 215 220

<210> 4
 30 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína de anclaje 1

<400> 4

5 Ala His Gly His Arg Pro
1 5

<210> 5

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Proteína de anclaje 2

<400> 5

Pro Ile His Asp His Asp His Pro His Leu Val Ile His Ser
1 5 10

20

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína de anclaje 3

30 <220>

<221> RASGO MISC

<222> (5)..(6)

<223> aminoácido esencial

<400> 6

Gly Met Thr Cys Xaa Xaa Cys

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2005/000046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 G01N33/564, G01N33/566, C07K14/705

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 G01N, C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OOSTING, J. D., DERKSEN, R. H. W. M., BOBBINK, I. W. G. et al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? Blood. Mayo 1993, Vol. 81, N° 10 pages 2618 - 2625.	1 - 38
Y	GU, J.-M., CRAWLEYS, J. T. B., FERRELL, G. et al. Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. The Journal of Biological Chemistry. Nov 2002, Vol. 277, N° 45, pages 43335 - 43343.	1-38
A	US 6037450 A (ESMON, C. T., STEARNS-KUROSAWA, D. J., KUROSAWA, S.) 14.03.2000. the whole document	2, 4, 5, 9 - 12, 15, 18, 19, 27 - 38

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 May 2005 (04.05.05)

Date of mailing of the international search report

11 May 2005 (11.05.05)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2005/000046

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0600088 A1 (YAMASA CORPORATION) 08.06.1994. page 3, lines 3- 6; page 6, lines 15-26; page 7, lines 18-41	2, 3, 7 - 10, 20 - 23, 25, 27, 29
A	US 6617145 B2 (BOONE, T. C., LI, H., MANN, M. B.) 09.09.2003. column 3, lines 19-30; sequence 22	10 - 14, 16 - 19, 30, 32, 33, 35, 37, 38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2005/000046

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US6037450 A	14.03.2000	NONE	-----
-----	-----	-----	-----
EP 0600088 A1	08.06.1994	CA 2107557 A1	06.08.1993
		WO 1993016387 A1	19.08.1993
		AU 3463393 A	03.09.1993
		US 5472883 A	05.12.1995
		AU 666352 B	08.02.1996
		AT 175275 T	15.01.1999
		DE 69322842 D, T	11.02.1999
		ES 2126644 T3	01.04.1999
		JP 2886983 B2	26.04.1999
-----	-----	-----	-----
US 6617145 B	09.09.2003	WO 0125445 A1	12.04.2001
		CA 2386185 A1	12.04.2001
		AU 7625400 A	10.05.2001
		US 6261820 B1	17.07.2001
		US 2002058322 A1	16.05.2002
		NO 20021501 A	31.05.2002
		BR 0014414 A	11.06.2002
		ZA 200202206 A	10.10.2002
		HU 0202650 A2	28.12.2002
		CN 1402788 A	12.03.2003
		JP 2003511034 T	25.03.2003
		BG 106577 A	30.04.2003
		CZ 20021034 A3	18.06.2003
		SK 4232002 A3	11.09.2003
		US 2003186422 A1	02.10.2003
		AU 767827 B2	27.11.2003
		NZ 517951 A	27.02.2004
		PL 355017 A1	22.03.2004
		AU 2004200776 A1	25.03.2004
		EP 1224298 B1	30.03.2005
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2005/000046

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ G01N33/564, G01N33/566, C07K14/705

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ G01N, C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	OOSTING, J. D., DERKSEN, R. H. W. M., BOBBINK, I. W. G. et al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? Blood. Mayo 1993, Vol. 81, Nº 10, páginas 2618 - 2625.	1 - 38
Y	GU, J.-M., CRAWLEYS, J. T. B., FERRELL, G. et al. Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. The Journal of Biological Chemistry. Noviembre 2002, Vol. 277, Nº 45, páginas 43335 - 43343.	1-38
A	US 6037450 A (ESMON, C. T., STEARNS-KUROSAWA, D. J., KUROSAWA, S.) 14.03.2000. Todo el documento.	2, 4, 5, 9 - 12, 15, 18, 19, 27 - 38

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

04.Mayo.2005 (04.05.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

11 MAY 2005 11.05.2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

E. Relaño Reyes

Nº de teléfono + 34 91 3493047

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2005/000046

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	EP 0600088 A1 (YAMASA CORPORATION) 08.06.1994. Página 3, líneas 3 - 6; página 6, líneas 15 - 26; página 7, líneas 18 - 41.	2, 3, 7 - 10, 20 - 23, 25, 27, 29
A	US 6617145 B2 (BOONE, T. C., LI, H., MANN, M. B.) 09.09.2003. Columna 3, líneas 19 - 30, secuencia 22	10 - 14, 16 - 19, 30, 32, 33, 35, 37, 38

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2005/000046

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US6037450 A	14.03.2000	NINGUNO	-----
EP 0600088 A1	08.06.1994	CA 2107557 A1 WO 1993016387 A1 AU 3463393 A US 5472883 A AU 666352 B AT 175275 T DE 69322842 D, T ES 2126644 T3 JP 2886983 B2	06.08.1993 19.08.1993 03.09.1993 05.12.1995 08.02.1996 15.01.1999 11.02.1999 01.04.1999 26.04.1999
US 6617145 B	09.09.2003	WO 0125445 A1 CA 2386185 A1 AU 7625400 A US 6261820 B1 US 2002058322 A1 NO 20021501 A BR 0014414 A ZA 200202206 A HU 0202650 A2 CN 1402788 A JP 2003511034 T BG 106577 A CZ 20021034 A3 SK 4232002 A3 US 2003186422 A1 AU 767827 B2 NZ 517951 A PL 355017 A1 AU 2004200776 A1 EP 1224298 B1	12.04.2001 12.04.2001 10.05.2001 17.07.2001 16.05.2002 31.05.2002 11.06.2002 10.10.2002 28.12.2002 12.03.2003 25.03.2003 30.04.2003 18.06.2003 11.09.2003 02.10.2003 27.11.2003 27.02.2004 22.03.2004 25.03.2004 30.03.2005